

VARIABILIDADE GENÉTICA EM UMA POPULAÇÃO REMANESCENTE DE ARAUCÁRIA NO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU, BRASIL

Jarbas Y. Shimizu¹
Peterson Jaeger²
Simone A. Sopchaki³

RESUMO

Foram coletadas amostras de tecido vegetativo de brotos de 120 árvores de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., representando a população natural de araucária do Parque Nacional do Iguaçu, localizado no município de Céu Azul, PR. Essas amostras foram analisadas quanto às frequências genotípicas e alélicas de isoenzimas. As enzimas HEX e IDH mostraram-se monomórficas, enquanto que as demais (ACP, F-EST, ME, 6PGD, PGI, PGM e SKDH) apresentaram variados graus de polimorfismo. A heterozigosidade média esperada, estimada em 0,248, foi maior que a média em vários gêneros de coníferas. Esse valor não se diferenciou significativamente da heterozigosidade observada (0,240), mostrando que a referida população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse equilíbrio vem sendo mantido na referida população, possivelmente, devido à ausência de distúrbios que afetem a sua estrutura genética. O número médio de alelos por loco foi de 2,3 e 80% dos locos observados apresentaram polimorfismo. As frequências alélicas apresentaram-se em equilíbrio nos locos ACP1, PGM1 e SKDH2, enquanto que, nos demais, os desequilíbrios foram decorrentes de excessos ou de deficiências de heterozigotos, em relação às frequências esperadas.

PALAVRAS-CHAVE: diversidade genética; eletroforese; isoenzimas.

¹ Eng. Florestal, Ph.D., CREA 26.763-D, Pesquisador da *Embrapa Florestas*

² Bolsista, Estudante de Engenharia Florestal da UFPR.

³ Assistente de Operações da *Embrapa Florestas*.

GENETIC VARIABILITY IN A REMNANT POPULATION OF ARAUCARIA IN THE IGUAÇU NATIONAL PARK, BRAZIL

ABSTRACT

Bud tissue samples of 120 adult araucaria (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.) trees, representing a natural population of the species in the Iguaçu National Park were analyzed with regard to isozyme polymorphism. HEX and IDH loci were monomorphic, while the others (ACP, F-EST, ME, 6PGD, PGI, PGM, and SKDH) showed varied degrees of polymorphism. The expected heterozygosity was estimated as 0.248, which is higher than the average in several conifers. This value was not significantly different from the observed heterozygosity (0.240) in the population. This suggests that Hardy-Weinberg equilibrium is being maintained, possibly by the absence of human disturbances which could disrupt the genetic structure in the population. The average number of alleles per locus was 2.3 and 80% of the loci were declared polymorphic. Allele frequencies were in equilibrium in ACP1, PGM1, and SKDH2 loci while, in others, the disequilibrium was due to either excess or deficiency of heterozygotes.

KEY-WORDS: genetic diversity; electrophoresis; isoenzymes.

1. INTRODUÇÃO

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze) é uma espécie conífera, arbórea, nativa da Região Sul e Sudeste do Brasil, que já constituiu o principal item da economia florestal do país (De-Hoogh, 1981). Ela é componente da Floresta Ombrófila Mista ou Floresta de Araucária, que se estende pelo Planalto Meridional, formando povoamentos puros ou mistos com espécies folhosas e, por vezes, separados por extensões variadas de campos naturais que, segundo Klein (1960), são remanescentes da vegetação predominante antes da expansão dessa floresta. Sua distribuição natural era contínua nas porções mais elevadas do Planalto Meridional Brasileiro, nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Além disso, ela ocorre, descontinuamente, no Estado de São Paulo, nas serras de Paranapiacaba, Cantareira e Campos do Jordão; em Minas Gerais, nas regiões de Poços de Caldas e na Serra da

Mantiqueira; e, no Rio de Janeiro, no maciço de Itatiaia e na Serra da Bocaina (Reitz & Klein, 1966; Gubert Filho, 1989).

Grande parte dos povoamentos naturais de araucária já foi devastada para a exploração da madeira, bem como para a expansão da agropecuária e de reflorestamentos com espécies exóticas de rápido crescimento (Gubert Filho, 1989). Além disso, as populações remanescentes encontram-se, normalmente, degradadas, devido à remoção das árvores de melhor qualidade para a extração da madeira. Assim, a maioria dos remanescentes encontra-se em forma de fragmentos de populações de variados tamanhos, quase sempre em formações mistas, com espécies folhosas, com densos sub-bosques que dificultam a regeneração natural da araucária.

A redução no tamanho das populações propicia o aumento da endogamia, que tem efeitos deletérios sobre a sobrevivência e vigor das espécies florestais arbóreas (Eldridge & Griffin, 1983; Park & Fowler, 1982). A excessiva fragmentação das populações submete-as a um acentuado efeito de borda e à redução no seu tamanho efetivo, comprometendo a sustentabilidade tanto das populações da espécie em questão, quanto dos demais organismos, plantas ou animais associados (Viana et al., 1992). No caso da araucária, grande parte do remanescente pode estar se tornando inviável e sujeita ao desaparecimento, devido ao rompimento da dinâmica da sua regeneração, amadurecimento e reprodução. Ademais, mesmo que esse ciclo se complete, o pequeno tamanho efetivo das populações nos fragmentos torna as futuras gerações cada vez mais débeis devido ao aumento da endogamia e perda de alelos pelo efeito da deriva genética.

Portanto, na presente situação, se não forem tomadas medidas imediatas de conservação desse germoplasma, corre-se o risco de se perder esse recurso genético florestal. A forma mais segura de se conservar esse material é através do estabelecimento de novas populações, sob regimes de manejo, em sistemas de produção florestal ou, sob forma de bancos ativos de germoplasma, em locais protegidos, para servirem de reserva de material genético para futuras plantações ou regenerações naturais.

Para se estabelecer bancos de germoplasma, com semente coletada das populações naturais, é necessário, primeiramente, determinar a natureza, a magnitude e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro dos fragmentos remanescentes. Tais informações são essenciais para que se possa identificar os fragmentos que, por pertencerem a populações já estabelecidas nos bancos, não requerem coletas adicionais, bem como aqueles que, por conterem características genéticas distintas, necessitam ser amostrados e estabelecidos em locais isolados. Neste caso, é fundamental que a escolha dos

fragmentos esteja embasada na informação sobre o padrão de variabilidade genética, garantindo, assim, uma eficiente coleta de amostras, no sentido de se conservar a máxima variabilidade, no menor número de bancos possíveis.

A existência de variabilidades entre populações de araucária, de diferentes procedências geográficas é conhecida (Baldanzi & Araujo, 1971; Fähler & Di Lucca, 1980; Gurgel Filho, 1980; Reitz & Klein, 1966; Shimizu & Higa, 1980; Monteiro & Speltz, 1980; Kageyama & Jacob, 1980; Shimizu, 1999). Esses estudos, no entanto, foram feitos com as características morfométricas que são, normalmente, controladas por muitos genes e altamente influenciadas pelos fatores ambientais, além de requererem vários anos de crescimento no campo para a sua avaliação. Uma alternativa mais rápida, que permite a análise de um maior número de variáveis e com menor influência pelos fatores ambientais, para estudos da variabilidade genética das populações, é através da análise do polimorfismo isoenzimático. O fenótipo isoenzimático é determinado, normalmente, em enzimas contidas em extrato de sementes ou de partes vegetativas da planta.

A maior parte da informação sobre a estrutura genética de populações em espécies florestais provém de espécies de clima temperado e sub-tropical, principalmente dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, por serem intensivamente cultivados em vários países (Moran & Bell, 1983). Existem vários estudos sobre estrutura genética em populações de coníferas (Conkle, 1971; Bergmann, 1973; Feret & Bergmann, 1976); o número de espécies estudadas e o de enzimas analisadas têm aumentado significativamente (Mitton, 1983).

As coníferas, em geral, apresentam alta variação genética dentro de espécies (Mitton, 1983; Hamrick et al., 1979). Populações de plantas de ciclo longo, como estas, tendem a apresentar alta variação genética, ampla distribuição geográfica, ser polinizadas pelo vento, ser mais comuns em estágios sucessionais avançados e ter alta fecundidade (Mitton, 1983).

O grau de variabilidade genética e o padrão de sua distribuição entre e dentro de populações são influenciados pelo tipo de habitat e pela localização geográfica. Hamrick et al. (1979) observaram diferentes padrões de variação entre populações de 22 espécies de coníferas, quanto ao polimorfismo isoenzimático. *Picea mariana*, *Pinus taeda* e *Pseudotsuga menziesii* apresentaram alta variação genética (Hamrick et al., 1981), enquanto que *Pinus resinosa* (Fowler & Morris, 1977) e *Thuja plicata* (Copes, 1981) não apresentaram variação genética nas proteínas solúveis. Esta última tem distribuição geográfica moderada mas, geralmente, ocorre em populações com baixa densidade (Mitton, 1983).

Muitas espécies de coníferas ocorrem em grandes populações, com distribuição contínua, enquanto que outras ocorrem em populações restritas e isoladas. Especialmente neste último caso, assim como nos pequenos fragmentos remanescentes, a deriva genética pode ocasionar erosão da variabilidade genética. Portanto, nos fragmentos de populações, como nos remanescentes de araucária, espera-se que a variabilidade genética seja menor dentro do que entre eles. No entanto, nas espécies coníferas, em geral, a maioria da variação genética é encontrada dentro de populações (Mitton, 1983), enquanto que, entre populações, parece não haver muita variação genética. O nível relativamente baixo de diferenciação genética nas características enzimáticas entre populações pode ser, em parte, atribuído ao sistema de reprodução cruzada e à dispersão de pólen e sementes pelo vento (Hamrick, 1983), já que estas características aumentam o potencial de intercâmbio e fluxo de genes entre populações. No caso da *Araucaria angustifolia*, existem algumas particularidades, como o fato de ser uma espécie dióica, da semente não ser dispersa pelo vento, e as grandes distâncias entre os fragmentos, que podem torná-la distinta das demais espécies, quanto ao padrão de variação genética. Assim, estudos básicos da estrutura genética das populações são necessários para otimizar a aplicação de recursos na conservação de seu germoplasma.

Este estudo teve como objetivo caracterizar, através de análise isoenzimática, a variabilidade genética dentro de uma população natural de araucária, situada em uma área protegida por lei, no Parque Nacional do Iguaçu, no Estado do Paraná. Por ser o primeiro estudo dessa natureza, envolvendo *Araucaria angustifolia*, com uma amostragem intensa, fornecerá informações importantes sobre a natureza da variação genética nos fragmentos remanescentes das populações desta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A população de araucária em estudo localiza-se no município de Céu Azul, dentro do Parque Nacional do Iguaçu, no sudoeste do Estado do Paraná. Essa população foi escolhida pelo fato de formar um povoamento natural bem definido, por apresentar maior extensão em relação aos demais fragmentos existentes na região, por estar protegida por lei e constituir fonte de semente para estabelecimento de povoamentos com fins produtivos ou de conservação em outros ambientes. Dentro desse povoamento, foram escolhidas três áreas de amostragem, onde o povoamento se apresentava com maior densidade. Em cada uma dessas áreas, foi demarcado um ponto aleatório, a partir do qual foram traçados transectos paralelos de 100 m de comprimento, em direção

aleatória, separados entre si por uma distância de 20 m. Ao longo de cada transecto, foram demarcados pontos amostrais a cada 20 m, marcando-se a árvore mais próxima a cada um desses pontos para amostragem. Foram marcadas, no total, 120 árvores para representar a população.

De cada árvore marcada, foram coletados ramos terminais contendo brotos vegetativos. As porções terminais desses ramos foram embaladas em sacos plásticos que, após identificação, foram acondicionados em caixas térmicas, contendo gelo e serragem para resfriamento, sem contato direto com as amostras.

As enzimas foram extraídas com um tampão de extração, adaptado de Pitel & Cheliak (1984) (Tabela 1), após a trituração do tecido parenquimatoso do broto apical, banhado em nitrogênio líquido.

A mistura de tecido triturado com o tampão de extração foi submetida a centrifugação resfriada (2°C) por um minuto a 10.000 rpm para separar os detritos. As amostras de enzima foram, então, embebidas, individualmente, em papel absorvente e colocadas na linha de origem de migração, nos géis de amido, para a separação das isoenzimas por eletroforese.

Foram usados os sistemas gel/eletrodo de morfolina-citrato com pH 7,0 e histidina com pH 8, descritos, também, como sistemas 7 e 24, respectivamente, por Alfenas et al. (1998) (Tabela 2). As bandas de atividade enzimática nos géis foram reveladas com tampões específicos para cada enzima, conforme as descrições no Anexo 1. Em cada enzima, os locos que apresentaram atividade foram numerados em ordem crescente, inversamente a suas velocidades de migração (loco mais rápido = 1). Analogamente, os alelos dentro de cada loco foram numerados em ordem crescente, inversamente a suas velocidades de migração (alelo mais rápido no loco = 1).

Tabela 1. Componentes do tampão de extração de enzimas dos brotos de araucária.

COMPONENTES	QUANTIDADES
PVP-40	1,6 g
Sacarose	3,423 g
EDTA	2,9 mg
DTT	3,1 mg
Ácido ascórbico	22,7 mg
Soro de albumina bovina	20 mg
NAD	54,8 mg
Cisteína	21,1 mg
Tween 8	0,2 ml
Tergitol	0,2 ml
Polietileno glicol	400 mg
Mercaptoetanol*	0,06 ml
Tampão fosfato pH 6,8	20 ml

* Adicionado no momento do uso

Tabela 2. Componentes dos sistemas gel/eletrodo e condições de separação das isoenzimas de araucária.

TAMPÃO DO ELETRODO	TAMPÃO DO GEL	COND. DE CORRIDA
SISTEMA 7 (morfolina-citrato pH 7,0)*		
Ác. Cítrico anidro 8,41 g N-(3-aminopropil morfolina) para titulação até pH 7,0	Ác. cítrico anidro 8,41 g Água deionizada q.s.p 1000 ml N-(3-aminopropil morfolina) para titular até pH 7,0 Diluir para 1:20	70 mA constante por 4 h
SISTEMA 24 (histidina pH 8,0)*		
Citrato trissódico 105,82 g Água deionizada q.s.p. 1000 ml Ác. cítrico para titular até pH 8,0	Histidina 9,58 g Água deionizada q.s.p. 1000 ml NaOH para titular até pH 8,0 Diluir para 1:9	70 mA constante por 4 h 30 min

*Alfenas et al. (1998).

Os parâmetros genéticos populacionais foram determinados, usando-se

o programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989). As medidas de variabilidade genética, na caracterização da população em estudo, foram estimadas englobando todos os locos, simultaneamente (estimativas multilocos). Os seguintes parâmetros foram estimados: 1) heterozigosidade média observada - frequência média, por loco, de indivíduos heterozigotos entre os componentes da amostra; 2) heterozigosidade média esperada - frequência média de heterozigotos, por loco, esperada em uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg; 3) número médio de alelos por loco; 4) porcentagem de locos polimórficos - foram considerados polimórficos os locos nos quais foram observados mais de um alelo.

Foram avaliadas, também, as frequências genótípicas dentro de cada loco e estimados seus desvios em relação à esperada, em uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A significância desses desvios foi verificada com o teste de X^2 , com correção para amostras pequenas, conforme o procedimento de Levene (1949), citado por Swofford & Selander (1989). Nos casos em que são detectados mais de dois alelos por loco e as frequências esperadas de alguns genótipos são baixas, os resultados do teste X^2 são imprecisos. Assim, como forma de contornar esse problema, foi feito o agrupamento dos genótipos em três classes (AA = homozigotos para o alelo mais freqüente; AB = heterozigoto para o alelo mais freqüente e um dos demais; BB = todos os demais genótipos), para o teste de X^2 com um grau de liberdade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As enzimas que apresentaram atividade e resolução para se fazer leituras confiáveis dos genótipos isoenzimáticos foram as constantes da Tabela 3.

Tabela 3. Enzimas analisadas na população de araucária do Parque Nacional do Iguaçu.

Enzima	Sigla	Código (EC)
Fosfatase ácida	ACP	3.1.3.2
Esterase fluorescente	FEST	3.1.1.1
Hexoquinase	HEX	2.7.1.1
Desidrogenase isocítrica	IDH	1.1.1.42
Enzima málica	ME	1.1.1.40
6-Fosfogluconato desidrogenase	6PGD	1.1.1.44
Fosfogluose isomerase	PGI	5.3.1.9
Fosfoglucomutase	PGM	2.7.5.1
Xiquimato desidrogenase	SKD	1.1.1.25

Somente para FEST foi possível fazer leitura em dois locos. As enzimas IDH e HEX revelaram-se monomórficas (Tabela 4). A variabilidade em ME foi baixa, com ocorrência do alelo menos freqüente, de migração mais rápida do que o restante, em homozigose com 3,3% de freqüência, não sendo observado nenhum indivíduo heterozigoto.

Considerando todos os locos analisados em conjunto, a heterozigosidade observada foi de 0,240 que não diferiu substancialmente da esperada (0,248) em uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). Essa heterozigosidade foi maior do que as estimativas médias encontradas nos gêneros *Abies* (0,130), *Picea* (0,218), *Pinus* (0,136) e *Pseudotsuga* (0,163) (Hamrick et al., 1992). A heterozigosidade esperada em *Pinus halepensis* foi estimada em 0,179 (Loukas et al., 1983), 0,127 em *P. ponderosa* (O'Malley et al., 1979) e 0,146 em *P. rigida* (Guries & Ledig, 1982). Esses fatos indicam que a população de *Araucaria angustifolia* em questão tem alta diversidade genética, tendo mantido uma estrutura genética populacional equilibrada, possivelmente em decorrência da ausência de distúrbios que afetassem a sua estrutura genética. Essa integridade populacional foi possível devido à sua localização dentro de um parque nacional, onde não são permitidas intervenções.

Tabela 4. Freqüências alélicas e medidas de variabilidade genética da população natural de araucária do Parque Nacional do Iguaçu.

Alelos	Locos e tamanho de amostras									
	ACP1	FEST1	FEST2	ME2	PGI2	PGM1	SKD2	6PGD2	IDH1	HEX
1	0,008	0,344	0,487	0,033	0,101	0,950	0,158	0,133	1,000	1,000
2	0,929	0,656	0,508	0,967	0,861	0,050	0,842	0,354	0,000	0,000
3	0,063	0,000	0,004	0,000	0,038	0,000	0,000	0,346	0,000	0,000
4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000
N	120	109	118	120	119	120	120	120	120	120
HO	0,125	0,670	0,661	0,000	0,185	0,100	0,283	0,375	0,000	0,000
HE	0,133	0,453	0,506	0,065	0,248	0,095	0,268	0,712	0,000	0,000

HO = heterozigosidade observada;

HE = heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1978).

Observações feitas até então indicavam um baixo grau de polimorfismo na espécie, com base nos caracteres morfológicos que, segundo Golfari (1971), é decorrente do fato da *Araucaria* ser um gênero antigo, cujos registros fósseis datam do período Médio Jurássico (160 milhões a 180 milhões de anos atrás) (Ntima, 1968). No entanto, a análise isoenzimática mostrou o alto nível de polimorfismo, a despeito da antiguidade do gênero. Portanto, essas análises poderão ser usadas para a caracterização genética de populações desta espécie,

sem necessidade de tecnologias mais elaboradas.

A alta diversidade genética detectada na amostra dessa população enquadrou-se na expectativa de Hamrick et al. (1992), visto que a espécie apresenta características como o fato de ser espécie gimnosperma com longa expectativa de vida, ampla distribuição natural e de reprodução cruzada, cujas sementes são, normalmente, dispersas por animais.

O número médio de alelos por loco foi estimado em 2,3 e, entre os locos analisados, 80% apresentaram polimorfismo (Tabela 5). Apesar da ocorrência de enzimas monomórficas como IDH e HEX, bem como loco com baixo polimorfismo, como ME, esse percentual ainda é relativamente elevado porque, para declarar um loco polimórfico, foi adotado o critério de que bastava haver mais de um alelo.

Tabela 5. Medidas de variabilidade genética determinadas para a população natural de araucária, do Parque Nacional do Iguaçu, em amostras com tamanho médio de 118,6 (E.P. 1, 1) indivíduos por loco.

MEDIDAS DE VARIABILIDADE GENÉTICA	MÉDIA	ERRO PADRÃO
Heterozigosidade por loco observada	0,240	0,081
Heterozigosidade por loco esperada	0,248	0,076
Número de alelos por loco	2,30	0,30
Porcentagem de locos polimórficos	80,00	-

Na análise por loco, evidenciou-se que somente ACP1, PGM1 e SKD2 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (ANEXO 2). Os demais apresentaram desequilíbrio nas frequências genotípicas, devido tanto ao excesso, nos casos de FEST-1 e FEST-2, quanto à deficiência de heterozigotos, como nos casos de PGI-2, 6PGD-2 e ME-2, em relação às frequências esperadas em equilíbrio. No entanto, não está esclarecida a causa exata desses desvios, uma vez que não se tem conhecimento quanto à relação das frequências desses genótipos com qualquer característica fenotípica de relevância, na capacidade adaptativa da espécie. Outra possibilidade é o desvio decorrente da deriva genética que pode ter resultado, aleatoriamente, do processo de amostragem gamética durante a fecundação.

As estatísticas F (Tabela 6) mostraram variados graus de fixação alélica. Dentre os locos estudados, em média, ACP-1, FEST-1, FEST-2, PGI-2, PGM-1, e SKD-2 apresentaram ampla variabilidade, com baixos índices de fixação. Dentro de cada loco, as seguintes situações foram verificadas:

Tabela 6. Estatística F para alelos individuais e médias por loco(F_{IS})

Alelos	Locos e tamanho de amostras								MÉDIA GERAL
	ACP-1	FEST-1	FEST-2	ME-2	PGI-2	PGM-1	SKD-2	6PGD-2	
1	1,000	-0,511	-0,466	1,000	0,366	-0,045	0,275	0,230	
2	0,037	-0,511	-0,474	1,000	0,326	-0,045	0,275	0,421	
3	-0,056		-0,004		-0,039			0,603	
4								0,850	
Média	0,043	-0,511	-0,468	1,000	0,321	-0,045	0,275	0,540	0,063
N	120	109	118	120	119	120	120	120	

1) ACP-1: a variabilidade se restringiu, praticamente aos alelos 2 e 3, enquanto que o alelo 1 mostrou-se fixo;

2) FEST-1: ampla variabilidade foi verificada nos locos 1 e 2;

3) FEST-2: foram observados três alelos, todos com ampla variabilidade;

4) ME-2: tanto o alelo 1 quanto o 2 apresentaram-se somente nas formas homozigotas: a ausência de heterozigotos neste loco, na presente amostragem, requer mais estudos sobre esta enzima, uma vez que, nas condições normais, as formas heterozigotas deveriam estar presentes em maior frequência;

5) PGI-2: todos os alelos apresentaram variabilidade, especialmente o alelo 3;

6) PGM-1: os dois alelos presentes no loco apresentaram ampla variabilidade;

7) SKD-2: os dois alelos que se manifestaram apresentaram-se igualmente variáveis, sem indícios de fixação alélica;

8) 6PGD-2: dos quatro alelos detectados, o 1 e o 2 foram os mais variáveis, enquanto que o 3 e, especialmente o 4, tenderam mais à fixação na população em estudo.

Apesar dos diferentes estados de fixação dos alelos, observados dentro de cada loco, a população, como um todo, mostrou ampla variabilidade genética, com o índice de fixação médio geral, referente aos alelos de todos os locos, próximo a zero.

4. CONCLUSÕES

1. Os remanescentes de araucária do Parque Nacional do Iguaçu representam uma população em seu estado natural, sem distúrbios que tenham acarretado rompimento de sua estrutura genética. As frequências dos genótipos isoenzimáticos contidos nela encontram-se em equilíbrio (equilíbrio de Hardy-Weinberg).

2. A variabilidade genética da população de araucária do Parque Nacional do Iguaçu é ampla, apresentando polimorfismo em 80% dos locos isoenzimáticos, com média de 2,3 alelos por loco.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., ed. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: Ed. Da UFV, 1998. 574p.
- BALDANZI, G.; ARAUJO, A.J. Investigação sobre a variação geográfica na *Araucaria angustifolia* na Estação de Pesquisas Florestais de Rio Negro, Paraná. **Floresta**, Curitiba, v.3, n.2, p.37-42, 1971.
- BERGMANN, F. Genetic studies in *Picea abies* with the aid of isoenzyme identification. III. Geographical variation at 2 esterase and 2 leucine-aminopeptidase loci in swedish spruce populations. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.22, p.63-66, 1973.
- CONKLE, M.T. Inheritance of alcohol dehydrogenase and leucine aminopeptidase isozymes in knobcone pine. **Forest Science**, Washington, v.17, p.190-194, 1971.
- COPES, D.L. Isoenzyme uniformity in western red cedar seedlings from Oregon and Washington. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa v.11, p.451-453, 1981.
- ELDRIDGE, K.G.; GRIFFIN, A.R. Selfing effects in *Eucalyptus regnans*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.31, p.216-221, 1983.
- FÄHLER, J.C.; DI LUCCA, C.M. Variación geografica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.: informe preliminar a los 5 años. In: IUFRO MEETINGS ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979. Curitiba. **Forestry problems of the genus Araucaria**. Curitiba: FUPEF, 1980. p.96-101.

- FERET, P.P.; BERGMANN, F. Gel electrophoresis of proteins and enzymes. In: MIKSCHE, J.P., ed. **Modern methods in forest genetics**. New York: Springer-Verlag, 1976. p.49-77.
- FOWLER, D.P.; MORRIS R.W. Genetic diversity in red pine: evidence for low heterozygosity. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.7, p.341-347, 1977.
- GOLFARI, L. **Coníferas aptas para reflorestamento nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul**. Rio de Janeiro: IBDF, 1971. 69p. (IBDF. Boletim Técnico, 1).
- GUBERT FILHO, F.A. **Proposta para a criação de um sistema de unidades de conservação de *Araucaria angustifolia* no Estado do Paraná**. Curitiba: Instituto de Terras, Cartografia e Florestas, 1989. 36p.
- GURGEL FILHO, O.A. Sílvica da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. **Forestry problems of the genus Araucaria**. Curitiba: FUPEF, 1980. p.28-68.
- GURIES, R.R.; LEDIG, F.T. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). **Evolution**, Lawrence, n.36, p.387-402, 1982.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: CHAMBERS, S.; SCHONEWALD-COX, C. ed. **Genetics and wild population management**. Reading: Addison-Wesley, 1983.
- HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristics and eletrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.10, p.173-200, 1979.
- HAMRICK, J.L., MITTON, J.B.; LINHART, Y.B. Levels of genetic characteristics. In: CONKLE, M.T., coord. **Proceedings of the symposium on isozymes of north american forest trees and forest insects**. Berkeley: USDA. Forest Service, Southwest Forest and Range Experiment Station, 1981. p.35-41. (USDA. For. Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-48).
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SHERMAN-BROYLES, S.L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. In: ADAMS, W.T.; STRAUSS, S.H.; COPES, D.L.; GRIFFIN, A.R. ed. **Population genetics of forest trees**. Boston: Kluwer Academic Publ., 1992. p.95-124.
- HOOGH, R.J. de **Site nutrition-growth relationships of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. in Southern Brazil**. Freiburg im Breisgau: Albert-Ludwigs Universität 1981. 161p. Inaugural Doctoral Dissertation.

- KAGEYAMA, P.Y.; JACOB, W.S. Variação genética entre e dentro de populações de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. **Forestry problems of the genus Araucaria**. Curitiba: FUPEF, 1980. p.83-86.
- KLEIN, R.M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, Itajaí, n.18, p.7-48, 1960.
- LOUKAS, M.; VERGINI, Y.; KRIMBAS, C.B. Isozyme variation and heterozygosity in *Pinus halepensis* L. **Biochemical Genetics**, New York, v.21, n.5/6, p.497-509, 1983.
- MITTON, J.B. Conifers. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J., ed. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.443-472.
- MONTEIRO, R.F.R.; SPELTZ, R.M. Ensaio de 24 procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. **Forestry problems of the genus Araucaria**. Curitiba: FUPEF, 1980. p.181-200, 1980.
- MORAN, G.F.; BELL, J.C. *Eucalyptus*. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. ed. **Isoenzymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.423-441.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Baltimore, v.89, p.583-590, 1978.
- NTIMA, O.O., comp. **The Araucarias**. Oxford: Commonwealth Forestry Institute, 1968. 139p. (Fast Growing Timber Trees of the Lowland Tropics, 3).
- O'MALLEY, D.M.; ALLENDORF, F.W.; BLAKE, G.M. Inheritance of isozyme variation and heterozygosity in *Pinus ponderosa*. **Biochemical Genetics**, New York, v.17, p.233-250, 1979.
- PARK, Y.S.; FOWLER, D.P. Effects of inbreeding and genetic variances in a natural population of Tamarax (*Larix laricina* (Du Roi) K.Koch) in eastern Canada. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.32, p.21-26, 1982.
- PITEL, J.A.; CHELIAK, W.M. **Effect of extraction buffers on characterization of isoenzymes from vegetative tissues of five conifer species: a user's manual**. Chalk River: Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service, Department of Agriculture, 1984. 64p. (Information Report PI-X-34).
- REITZ, R.; KLEIN, R.M. **Araucariaceae**. Itajaí: Herbario Barbosa Rodrigues, 1966. 62p. (Flora Illustrada Catarinense).

- SHIMIZU, J.Y. Variação entre procedências de araucária em Ribeirão Branco (SP) aos vinte e três anos de idade. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 38, p.89-102, jan./jun. 1999.
- SHIMIZU, J.Y.; HIGA, A.R. Variação genética entre procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. na região de Itapeva, SP, estimada até o 6º ano de idade. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. **Forestry problems of the genus Araucaria**. Curitiba: FUPEF, 1980. p.78-82.
- SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. **Biosys-1**: a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Champaign: Illinois Natural History Survey, 1989. 43p.
- VIANA, V.M.; TABANEZ, A.J.A.; MARTINEZ, J.L.A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.4, n. único, p.400-406, 1992.

ANEXO 1

Componentes dos tampões de revelação das atividades enzimáticas em fatias de gel

ACP	EC 3.1.3.2	Quantidades
Tampão acetato de sódio 0,2M pH5,0		25 ml
MgCl ₂ (10%)		0,3 ml
Fosfato de ác. α-naftil		12,5 mg
Sal GBC de Fast garnet		12,5 mg
IDH	EC 1.1.1.42	Quantidades
Tris HCl 1M pH 8,0		2,5 ml
MgCl ₂ (10%)		0,2 ml
Água		22,5 ml
NADP		3,0 mg
Ác. isocítrico triissódico		5,0 mg
MTT (5 mg/ml)		1,0 ml
PMS (3 mg/ml)		1,5 ml
ME	EC 1.1.1.40	Quantidades
Citrato de morfolina pH 6,1		12,5 ml
Ác. DL-málico 0,5M pH 7,0		2,5 ml
MgCl ₂ (10%)		0,5 ml
NADP		5,0 mg
MTT (5 mg/ml)		1,0 ml
PMS (3 mg/ml)		2,5 ml
PGI	EC 5.3.1.9	Quantidades
Tris HCl 1M pH 8,0		2,5 ml
MgCl ₂ (10%)		0,25 ml
Água		22,5 ml
NADP		3,5 mg
MTT (5 mg/ml)		1,0 ml
PMS (3 mg/ml)		1,0 ml
G-6-PDH		3,1 ml
F-6-P (5,48 mg/ml)		1,75 ml

HEX	EC 2.7.1.1	Quantidades
Tris HCl 1M pH 8,0		2,5 ml
MgCl ₂ (10%)		0,3 ml
Água		22,5 ml
NADP		6,6 mg
ATP		6,6 mg
Glucose		23,0 mg
NBT		5,0 mg
PMS (3 mg/ml)		1,0 mg
G-6-PDH (10 unid./ml)		2,5 ml

6-PGDH	EC 1.1.1.44	Quantidades
Tris HCl 1M pH 8,0		2,5 ml
MgCl ₂ (10%)		0,2 ml
Água		22,5 ml
NADP		3,0 mg
Ac. 6-fosfogluconico trissódico		6,0 mg
MTT (5 mg/ml)		3,75 mg
PMS (3 mg/ml)		1,5 mg

PGM	EC 2.7.5.1	Quantidades
Tris HCl 1M pH 8,0		2,5 ml
MgCl ₂ (10%)		0,5 ml
Água		17,0 ml
NADP		4,0 mg
NBT		5,0 mg
PMS (3 mg/ml)		2,25 mg
G-1-P		25,0 mg
G-1,6-DP (0,05%)		0,75 ml
G-6-PDH (10 unid./ml)		4,2 ml

FEST	EC 3.1.1.1	Quantidades
Tampão acetato de sódio 0,07M pH 5,0		10,0 ml
4-metil umbeliferil butirato		1,0 mg
Acetona		3,0 ml
Observação sob luz UV		

SKDH	EC 1.1.1.25	Quantidades
Tris HCl 1M pH 8,0		2,5 ml
Água		22,5 ml
NADP		5,0 mg
Ác. xiquímico		25,0 mg
NBT		5,0 mg
PMS (3 mg/ml)		1,5 mg

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o inestimável auxílio da organização EcosConsult que viabilizou a execução deste trabalho, através de apoio logístico e custeio de um bolsista.

ANEXO 2

Teste de χ^2 para desvios das frequências genotípicas, em cada loco, em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (corrigido para amostras pequenas).

LOCOS	GENÓTIPOS	FREQUÊNCIAS		χ^2	GL	P
		OBSERVADA	ESPERADA			
ACP1	11	1	0,004	0,375	1	0,540
	12	0	1,866			
	13	0	0,126			
	22	104	103,569			
	23	15	13,996			
	33	0	0,439			
	AA	104	103,569			
	AB	15	15,862			
FEST1	BB	1	0,569	25,082	1	0,000
	11	1	12,788			
	12	73	49,424			
FEST2	22	35	46,788	11,945	1	0,001
	11	19	27,894			
	12	77	58,723			
	13	0	0,489			
	22	21	30,383			
	23	1	0,511			
	33	0	0,000			
	AA	21	30,383			
ME2	AB	78	59,234	136,589	1	0,000
	BB	19	28,383			
	11	4	0,117			
PGI2	12	0	7,766	8,542	1	0,003
	22	116	112,117			
	11	5	1,165			
	12	13	20,759			
	13	1	0,911			
	22	92	88,228			
	23	8	7,785			
	33	0	0,152			
PGM1	AA	92	88,228	0,304	1	0,582
	AB	21	28,544			
	BB	6	2,228			
SKD2	11	108	108,276	0,422	1	0,516
	12	12	11,448			
	22	0	0,276			
6-PGDH2	11	2	2,941	27,222	1	0,000
	12	34	32,117			
	22	84	84,941			
	11	5	2,075			
	12	6	11,381			
	13	15	11,113			
	14	1	5,356			
	22	28	14,937			
	23	14	29,519			
	24	9	14,226			
	33	27	14,238			
	34	0	13,891			
	44	15	3,264			
	AA	28	14,937			
	AB	29	55,126			
	BB	63	49,937			

AA= homozigoto para o alelo mais frequente;

AB= heterozigoto para o alelo mais frequente e um dos demais;

BB= todos os demais genótipos.